

UNCERTIFIED TRANSLATION

Cyclodextrin patent (translated)

(54) Protein Stabilizing Agent

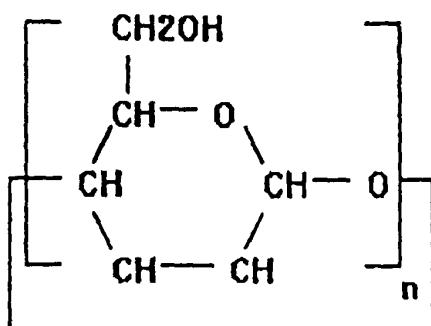
(11) 59-104556 (A) (43) 16.6.1984 (19) Japanese patent

(21) Appl. no. 57-215236 (22) 7.12.1982

(71) Sekisui Kagaku Kogyo K.K. (72) Kazutoshi Yamazaki (2)

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

1. General formula



(in formula, n is 6-8 integer)

Protein stabilizer of cyclized oligosaccharide is shown in the above formula.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Aldoses such as glucose have been used to prevent denaturation of protein in blood and enzyme. These aldoses usually have active hydroxide groups which denatures the protein by a nonenzymatic reaction with the amino acids of the protein at normal temperatures (5–30°C). For example, the amino acids of the β chain of hemoglobin (Hb) A might react with glucose. When blood is stored at 4 °C, Hb becomes saccharified and the level of HbA₁ a+b is raised. Since the reduced sugar reacts with the terminal amino group or lysine residue easily, human Hb changes to HbA_{1c} by the saccharified reaction between HbA and glucose in vitro or in vivo. An enzyme is also saccharified by a similar reaction, and its activity is decreased. The purpose of this invention is to prevent the denaturation of protein in blood and enzyme.

The main purpose is to stabilize proteins by cyclized oligosaccharides which have the formula shown above.

Proteins in blood and enzymes are composed of amino acids and maintain a three dimensional formation through the secondary binding of amino acids. But protein is easily denatured by cutting its secondary binding. Measuring Hb and saccharified Hb in blood are regular medical test items, but Hb is denatured easily. For example, Hb denatures during storage, and when saccharified Hb is measured by high performance chromatography, denatured Hb is eluted at the same position as saccharified Hb. As a result, saccharified Hb will be over estimated. Therefore, to accurately measure saccharified Hb, it is necessary to stabilize Hb in the sample before storage. The aldose which has been used as a stabilizer, glycosylates the terminal amino group of Hb and makes saccharified Hb, so that the detection of this saccharified Hb is obviated as a positive error. Hence, aldoses are not appropriate as stabilizers for protein. Various studies have been done with respect to saccharides in order to prevent the denaturation of protein in blood and enzyme, and as a result, it is found that the cyclized oligosaccharide having the constitutional formula shown in the figure, that is cyclodextrin, consisting of 1.4 bond of dextrose, provides an excellent effect as a protein stabilizer for blood and enzyme. Three types of cyclodextrin (α -, β -, γ -) are prepared from starch by a reaction with amylase. α -cyclodextrin, β -cyclodextrin and γ -cyclodextrin can be used individually or together. The optimum concentration of cyclodextrin used as stabilizer for blood and enzyme is from 0.001 mole to 0.01 mole. The denaturation of the protein can be prevented for a long period of time, and in the case of, for example, blood, the detection of the hemoglobin saccharified by the denatured protein as a positive error is obviated in a clinical measurement of a saccharified hemoglobin value. The decrease in the activity of enzyme is obviated in the stage of a measurement relating to enzyme.

EXAMPLE 1

One ml of octyl??enoxypolycethoxyethanol as a hemolysis reagent and 0.5 ml of β -cyclodextrin as the protein stabilizer were added to 1,000 ml of distilled water. Ten μ l of normal plasma treated with anticoagulant reagent was mixed with 1.5 ml of the above solution and stored at 24°C. Samples were taken out of the mixture after 0, 5, 10 and 15 hours, and the value of HbA_{1a+b} was measured by high performance liquid chromatography. The result is shown in figure 1. The result without β -cyclodextrin is also shown as open circles for comparison. The denaturation of protein was less with β -cyclodextrin than without β -cyclodextrin. After 15 hours, the value of HbA_{1a+b} in the sample with β -cyclodextrin was 60% of that without β -cyclodextrin.

EXAMPLE 2

Two grams of α -cyclodextrin were used instead of 0.5g of β -cyclodextrin under the same conditions as in example 1. The value of HbA₁ a+b measured by high performance liquid chromatography was 3.6%. The result was 87% of the value without α -cyclodextrin.

EXAMPLE 3

0.2g of γ -cyclodextrin was used instead of 0.5g of β -cyclodextrin under the same conditions as in example 1. The value of HbA₁ a+b measured by high performance liquid chromatography was 3.9%. The result was 86% of the value without γ -cyclodextrin.

EXAMPLE 4

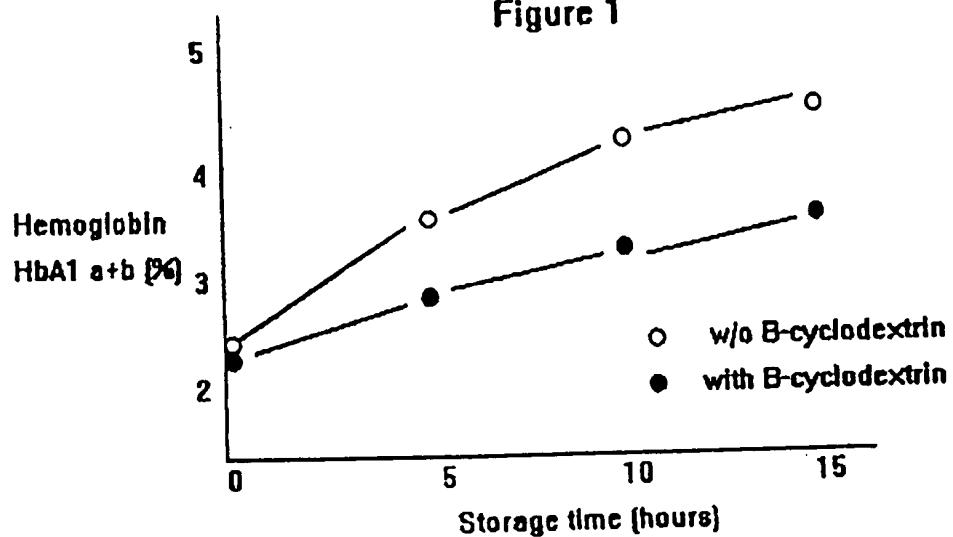
An ammonium sulfate suspension containing 5 mg/ml of β -galactosidase (β -Gal) was centrifuged at 2,000g for 15min.. The precipitate was collected and reconstituted with 1 ml of 0.01M-phosphate buffer (pH7.0) containing 1mM-magnesium chloride and 0.1M-sodium chloride. The solution, called β -Gal solution, was diluted 121 times with phosphate buffer and mixed with β -cyclodextrin solution in phosphate buffer at the ratio of 1 to 1 and incubated at 37°C for 20 hours. The activity in β -Gal was measured by the following method. 50 μ l of mixture was mixed with 500 μ l of 0.02M-phosphate buffer, pH7.2 containing 0.1%-oruso-niophenyl β -D-galactopyranoside, 1mM-sodium magnesium, 0.1M-sodium chloride, 0.1%-bovine serum albumin, and 0.1%-sodium azide at 30°C for 30 minute. The enzymatic reaction was stopped by adding 0.1M-sodium carbonate and the absorption of ortho-niophenyl derived from oruso-niophenyl β -D-galactopyranoside was measured at a 420 nm wavelength. The ratio of absorbance of the sample with and of the sample without stabilizer was used as the indicator for stability of the enzyme. The ratio at a concentration of 0.001M- β -cyclodextrin was 1.44 and 1.54 at 0.01M- β -cyclodextrin.

EXPLANATION OF FIGURE

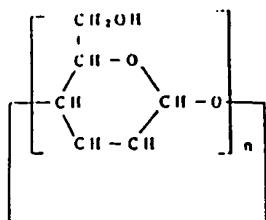
The relationship between the value of HbA₁a+b and storage time with and without β -cyclodextrin is shown in figure 1.

Patent Applicant
Seikisui Kagaku Kogyo K.K.
Representative: Mototoshi Fujinuma

Figure 1



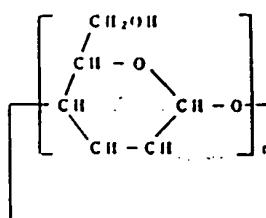
一般式



(但し上式において α は6乃至8の整数)
であるされる環化オリゴ糖からなる蛋白質安定剤に存在する。
次に本発明蛋白質安定剤について更に詳細に説明する。
血液、酵素等の蛋白質はアミノ酸を構成成分とし、その二次結合によって立体的形状が保たれている。しかしその二次結合は切断を受け、蛋白質の特性を失なうことになりやすい。
ところで血液中のHbは、血中Hb濃度測定及び血中酸化Hb濃度測定等の臨床検査の対象となるが、このHbも変性を生ずる。例えば酸化Hbの測定では測定検体の保存中にHbの変性を生

じ、変性Hbは高浓度体クロロトグリオサイドによる分離測定では酸化Hbの位置に溶出されるため、見掛け上変性Hbが増加すると酸化Hb濃度に対し正の誤差を生ずる。このため元々検体に含まれていた正確な酸化Hb濃度を測定するには検体の保存及び使用中にHbの変性を防ぐことが必要となる。しかしこれを実用されてきたアルドース類ではHbのアミノ末端とグリコシル化し糖化ヘモグロビンとなるので、元々検体中に含まれていた酸化Hb濃度に対して正の誤差を生ずる。このためアルドース類は蛋白質安定剤としての適用性を欠いている。
そこで血液、酵素の蛋白質の変性を防ぐために本発明者が始めについて種々検討を行った結果次の構造式を有する環化オリゴ糖が血液、酵素の蛋白質安定剤としてすぐれた効果が得られることを見出した。

すなはち



上式において α の値は6、7又は8である。
上記の環化オリゴ糖はデキストロースのL型結合からなるシクロデキストリンである。
上記の環化オリゴ糖を得るには、デンプン類にアミラーゼを作用させて分解させ、その分解物に四塩化エチレン-四塩化エタン混合溶媒を加えてシクロデキストリン混合物を沈殿させる。
ついでその沈殿物を水に溶解させてアーファンを加えると、 β -シクロデキストリン($\alpha=7$)、 γ -シクロデキストリン($\alpha=8$)のみが沈殿し、溶液内には α -シクロデキストリン($\alpha=6$)と一部の β -シクロデキストリン及び γ -シクロデキストリンが残る。さらに α -シクロデキストリンをシクロヘキサンにより、 β -シ

クロデキストリンをフルオロベンゼンにより、 γ -シクロデキストリンをアントラセンにより夫々分別沈殿することにより3種のシクロデキストリンをデシパン分解管から収集することができる。

α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリンは夫々単独で使用されてもよいし、これらが併用されてもよい。これらは血液、酵素に対する安定剤として使用されるが、その場合の使用量は0.001モル乃至0.01モルの範囲に亘るものとされるのが普通である。

本発明によれば上記構造式の環化オリゴ糖が血液、酵素等に加えられることにより、蛋白質の変性を長期間防ぐことができ、例えば血液の場合には酸化Hbの濃度測定において蛋白質の変性による酸化Hbが正の誤差として測定されることのないものとなり、又酵素においても活性の低下をきたすことのないものとなる。

実験例1

清潔水 100 ml 中に、溶血剤としてオクナルソエノキシポリエトキシエタノール 1 ml、及び蛋白質安定化剤として β -シクロデキストリン 0.5 g を溶解した溶液 1.5 ml に既溶入状態固化血液 1.0 ml を混和し、からく瓶微波 24 W で保存し、0, 5, 10, 15 時間後の HbA_{1c} 価値を高速液体クロマトグラフィーにより分離測定した。その結果を第 1 図の実験グラフで示す。尚これとの比較のために β -シクロデキストリンのみを除いた溶液を用いて同一条件で HbA_{1c} 価値を測定した結果を第 1 図の点線グラフで示す。これらの結果から明らかのように、 β -シクロデキストリンを使用した場合は、使用しない場合に比較して蛋白質の経時変化が少なく、15 時間後の値では β -シクロデキストリン使用の場合は、使用しない場合に比較して 6 時程度に低減された。

実験例 2

実験例 1において β -シクロデキストリンに加えて β -シクロデキストリン 2 g を使用した以

外は実験例 1 と同様にして血液中の HbA_{1c} 価値を高速液体クロマトグラフィーにより分離測定した結果 3.6 % であり、 β -シクロデキストリンを使用しない場合の 8.7 % であった。

実験例 3

実験例 1において β -アキストリンに加えて γ -アキストリン 0.2 g を使用した以外は実験例 1 と同様にして血液中の HbA_{1c} 価値を高速液体クロマトグラフィーにより分離測定した結果 3.9 % であり、 γ -アキストリンを使用しない場合の 8.6 % であった。

実験例 4

5 mg/ml の β -ガラクトシダーゼ (以 F β -G β と略す) の破壊酵母を 2000 倍で 15 分間遠心分離しその上段を 1 M 増化マグネシウム、0.1 M 增化ナトリウムを含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 値 7.0) 1 ml に溶解させて β -G β 1 溶液を調製した。さらにその β -G β 1 溶液をリン酸緩衝液により 1:21 倍希釈したものと、 β -シクロデキストリンのサンプル溶液濃度を容積

比で 1:1 に混合後、1 がすつ試験管にとり、37 °C で 20 時間インキュベートした。その後、 β -G β の酵素活性を測定し、活性の低下を比較した。酵素活性の測定は、50 μl の酵素溶液を 500 μl の 0.1 M 増化のオルソニトロフェニル β -D-ガラクトビラノシド、1 M 增化マグネシウム、0.1 M 增化ナトリウム、0.1 M 増化の牛血清アルブミン、0.1 M 増化のアラバナトリウムを含む 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 値 7.2) と混合し、30 °C で 30 分反応後、2 ml の 0.1 M 增化ナトリウムを加えて酵素反応を停止させ、オルソニトロフェニル β -D-ガラクトビラノシドの分離によってタリクタノイドニトロフェノールの吸収を 420 nm の波長の可視分光光度計にてその吸光度によって求めた。この吸光度加算の入っているハングラムとの吸光度比を求め酵素活性を算出した。この酵素活性 β -シクロデキストリンの割合は 0.0011 で、これは活性化水 (活性) の吸光度ノブランクとの吸光度 (0.144) であり内因活性 0.116 では吸

化率は 1.5 % であった。

酵素の活性を説明

第 1 図は実験例 1において β -シクロデキストリンを使用した場合及び使用しない場合の HbA_{1c} 価値と液体保存時間との関係を示すグラフである。

特許出願人

日本化成工業株式会社

代表者 旗 部 康 利

-321

